

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Keemia Instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

TANEL LUIK

Luteiniseeriva hormooni ja inimese
kooriongonadotropiini retseptori aktivatsiooni uurimine
LH ja hCG võrdlusena

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Olga Mazina, MSc

Tartu 2015

KASUTATUD LÜHENDID

AC	adenülaadi tsüklaas
cAMP	tsükliline adenosinmonofosfaat
CFP	helesinine fluorestseeruv valk (<i>Cyan Fluorescent Protein</i>)
COS7-R	<i>Cercopithecus aethiops</i> neerurakkude püsiliin, mis sisaldab luteiniseeriva hormooni / inimese kooriongonadotropiini retseptorit
CRP	cAMP retseptorvalk
DMEM/F12	rakusööde (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12</i>)
DNA	desoksüribonukleiinhape
DPBS	puhverdatud soolalahus (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
EC ₅₀	kontsentratsioon, mille juures efekt on pool maksimaalsest
Epac	cAMPi siduv valk (<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>)
FBS	veise loote seerum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FRET	Försteri resonantsenergia ülekanne
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon
GDP	guanosiindifosfaat
GPCR	G-valguga seotud retseptor
GTP	guanosiintrifosfaat
hCG	inimese kooriongonadotropiin
HEK293	inimese embrüonaalsed neerurakud (<i>Human embryonic kidney</i>)
HLA-G	inimese leukotsüüdi antigeen klass G
IBMX	3-isobutüül-1-metüülksantiin
IU	rahvusvaheline ühik
IVF	<i>in vitro</i> viljastamine

KASUTATUD LÜHENDID

LH	luteiniseeriv hormoon
LHCGR	luteiniseeriva hormooni ja inimese kooriongonadotropiini retseptor
MOI	nakatuskordsus (<i>multiplicity of infection</i>)
mTurquoise	sinine fluorestsentsvalk
PDE	fosfodiesteras
PKA	proteiinkinaas A
RPMI	rakusööde (<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>)
SEM	aritmeetilise keskmise standardviga (<i>standard error of mean</i>)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> putuka munasarjast eraldatud rakuliin
cp173Venus	tsirkulaarselt permuteeritud kollane fluorestsentsvalk
YFP	kollane fluorestsentsvalk (<i>yellow fluorescent protein</i>)
WHO	Maailma Terviseorganisatsioon

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
Rakkude signaaliülekanne	6
Luteiniseeriva hormooni/inimese kooriongonadotropiini retseptor (LHCGR)	6
Luteiniseeriv hormoon ja kooriongonadotropiin, nende roll raseduse kulgemises	7
Kunstlik viljastamine	8
hCG määramine	9
cAMP	10
cAMP kontsentratsiooni jälgimine	11
Sensorvalgu ekspresseerimine	12
EKSPERIMENTAALNE OSA.....	13
Aparatuur ja materjalid	13
cAMP biosensori ekspresseerimine	13
Mõõtmised plaatfluorimeetriga	14
TULEMUSED JA ARUTELU.....	15
Luteiniseeriva hormooni ja kooriongonadotropiini preparaatide võrdlus	15
Edasisi rakendusi	18
KOKKUVÕTE.....	20
SUMMARY	21
KASUTATUD KIRJANDUS	22

SISSEJUHATUS

Viljatus on tänapäeval väga levinud probleem, millega puutub ühel või teisel kujul kokku ligi 15% kõikidest paaridest. Põhjuseid võib olla mitmeid, võrdselt meestel kui naistel, ning kui õnnestub need tuvastada, võib mõningatel juhtudel normaalse talitluse taastamiseks abi olla ravimitest või lõikustest. Kui põhjust ei leita või ravimid ei mõju, on paljudel juhtudel ainus võimalus kunstlik viljastamine.

Kunstliku viljastamise puhul on üks olulisemaid etappe sobivate embrüote valik implantatsiooniks. Embrüo kvaliteeti hinnatakse morfoloogilise vaatluse abil, kuid esimene viljastamiskatse ebaõnnestub ligi 75%-l juhtudest (Licht *et al.* 2007) ning rasestumiseks tuleb tihti protseduuri läbi viia mitu korda, mis on kulukas nii majanduslikult kui ajaliselt ning patsientide jaoks tülikas.

Selle probleemi vältimiseks on aktiivselt uurima hakatud mitmesuguseid embrüo poolt kasvulahusesse eritatavaid aineid ning nende seost implantatsiooni õnnestumisega. Nii luteiniseeriv hormoon (LH) kui ka inimese kooriongonadotropiin (hCG) mängivad loote varajases arengus olulist rolli, mistõttu võib nende tootmise ja sekreteerimise hulk olla korrelatsioonis kunstliku viljastamise õnnestumisega.

Hetkel kasutatakse nende hormoonide kontsentratsiooni määramisel valdavalt antikehadel baseeruvaid meetodeid, mille puhul aga ei pruugita eristada aktiivseid ja inaktiivseid hormone. Kui LH ja hCG siduda vastavale retseptorile (LHCGR) raku pinnal, põhjustavad rakusisese vastuse aga vaid aktiivsed hormoonid. LHCGR-i puhul põhjustab nende hormoonide sidumine rakusisese tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) kontsentratsiooni suurenemise.

Meie laboris on cAMP kontsentratsiooni muutuste detekteerimisel ning ligandide iseloomustamisel mitmetes erinevates rakuliinides edukalt kasutatud Försteri resonantsenergia ülekandel (FRET) baseeruvat biosensorit. Käesoleva töö eesmärgiks oli seada sisse FRET sensoriga katsesüsteem LH ja hCG mõju uurimiseks LHCGR-ile, võrrelda neid hormone omavahel ning kirjanduse andmetega.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Rakkude signaaliülekanne

Kõik organismid suudavad reageerida välistele mõjutustele, millest suur osa antakse edasi läbi rakkude, kasutades hormoonide, kasvufaktorite ja muude molekulide kontsentratsioonimuutusi. Need bioaktiivsed ained, mida nimetatakse ligandideks, seostuvad rakumembraanil asuvatele retseptoritele, põhjustades muutusi rakkude, ning lõpuks ka kogu organismi, talitluses (Siegel *et al.* 2006). G-valkudega seotud retseptorid (ingl. k. *G-protein coupled receptors*, GPCR) moodustavad suurima membraanseotud retseptorite perekonna ning nende valkude kaudu on reguleeritud väga paljud kehaomased protsessid, näiteks nägemis-, haistmis- ja maitsmismeeled, immuunsüsteemi töö, vererõhk ja seedimine. Seetõttu on väga paljude tänapäevaste ravimite sihtmärgiks just GPCR-id (Lagerström & Schiöth 2008).

GPCR-idel on iseloomulik seitsme membraani läbiva heeliksi olemasolu, mis on ühendatud rakusiseste ning -väliste aasadega, mille struktuur on väga varieeruv ning võimaldab seega siduda spetsiifilisi ligande. Rakkude sisemuses, membraani vahetus läheduses, asuvad guaniinnukleotiide siduvad kolmest alaühikust (α , β , γ) koosnevad G-valgud, millel on oluline roll retseptori poolt vastu võetud signaali edasikandmisel. Aktiveeritud retseptor mõjutab lähedalasuva heterotrimeerse G-valgu konformatsiooni, mille tagajärjel vahetab see α -alaühiku poolt seotud guanosiindifosfaadi (GDP) guanosiintrifosfaadi (GTP) vastu ning dissotsieerub kaheks osaks (α -alaühikuks ning $\beta\gamma$ dimeeriks), kusjuures kumbki võib aktiveerida või inhibeerida edasisi efektormolekule (Siegel *et al.* 2006). α -alaühiku põhjal saab G-valgud jaotada neljaks: G_s , mis stimuleerib membraanile kinnitunud ensüümi adenülaadi tsüklaasi, G_i , mis inhibeerib adenülaadi tsüklaasi (AC) või aktiveerib kaaliumi ionkanaleid, G_q , mis aktiveerib ensüümi fosfolipaas C-d, ja G_o , mis aitab närvirakkudes sulgeda kaltsiumi kanaleid (Patrick, 2013). Lõplik vastus ja edasised signaali vahendajad sõltuvad nii ligandist, retseptorist kui ka G-valgu tüübist (Siegel *et al.* 2006).

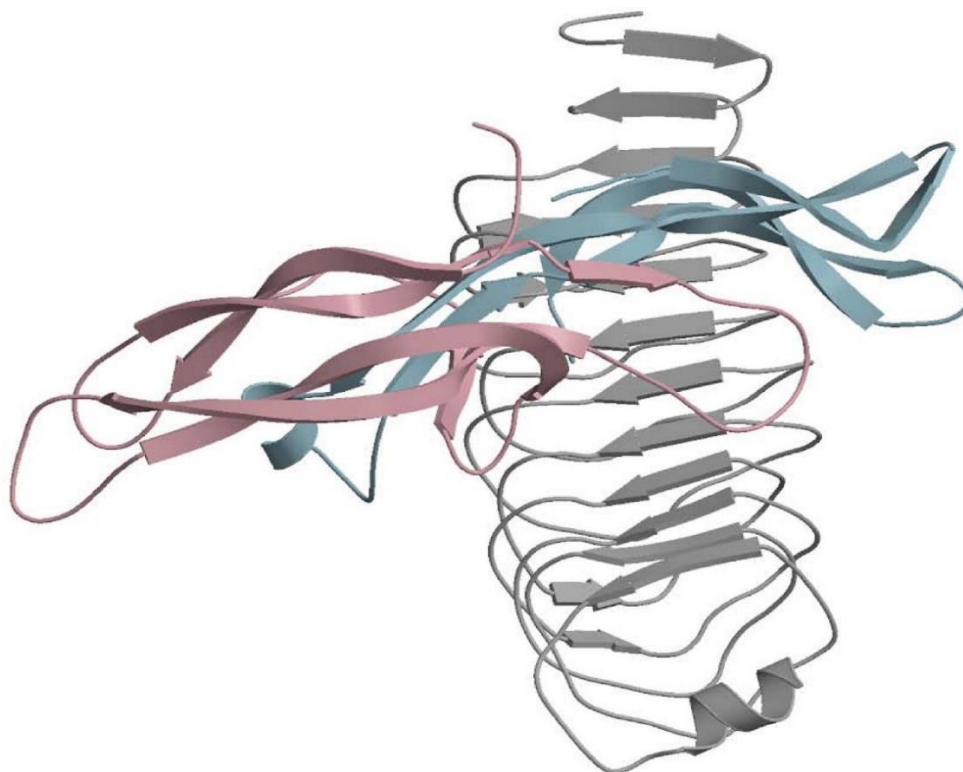
Luteiniseeriva hormooni/inimese kooriongonadotropiini retseptor (LHCGR)

LHCG retseptoril on asendamatu roll normaalses seksuaalses arengus ja paljunemise funktsioonis, mistõttu leidub retseptorit valdavalt munasarjades, munandites, emakas, platsentas; siiski on retseptorit leitud ka paljudes teistes kudedes ja rakkudes, sealhulgas ajus, selgroos ja nahas (Ziecik *et al.* 2007). See 75 kDa massiga glükoproteiin koosneb kahest funktsionaalsest osast: rakuvälisest hormoone siduvast domeenist ja 7-

transmembraanses/tsütoplasmilises osas, mis seob ja aktiveerib G-valku. LHCGR seostub peamiselt G_s valguga ja osaliselt ka $G_{q/11}$ ja G_i -ga, mõjutades seega nii adenülaadi tsüklaasi/tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) kui ka fosfolipaas C/inositool trifosfaadi signaalradasid (Dufau & Tsai-Morris, 2007).

Luteiniseeriv hormoon ja kooriongonadotropiin, nende roll raseduse kulgemises

Luteiniseeriv hormoon (LH) ja inimese kooriongonadotropiin (hCG) kuuluvad glükoproteiinhormooni ja tsüsteiini-sõlme kasvufaktori perekonda. Tegu on heterodimeeridega, mis koosnevad mittekovalentselt seotud α ja β alaühikutest (Joonis 1). Glükoproteiinhormoonide, sealhulgas ka folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja türoidi stimuleeriva hormooni (TSH), α -alaühikud on peaaegu identsed ja oluliselt erinevad üksteisest vaid β -alaühikud. Kuigi LH-l ja hCG-l on sarnased primaar- ja sekundaarstruktuurid ja need hormoonid seostuvad samale retseptorile ning omavad sarnast bioloogilist funktsiooni, lagundatakse hCG organismis aeglasemalt ning see on kõrgema afiinsusega kui LH (Rao & Lei, 2007), tõrjudes retseptorile seotud radioaktiivmärgisega [125 I]hCG välja ligi 10 korda madalama kontsentratsiooni juures kui LH (IC_{50} : LH, $13,0 \pm 5,9$ pM; hCG, $1,7 \pm 0,7$ pM) (Müller *et al.* 2003).



Joonis 1. Luteiniseeriv hormoon kompleksis LHCG retseptoriga, mudel koostatud D. Puetti uurimisrühma poolt. Pildil on halli värviga tähistatud retseptor, sinisega LH α -alaühik, mis on väga sarnane hCG α -alaühikule, ja roosaga β -alaühik, mis erineb hCG vastavast alaühikust oluliselt (Puett *et al.* 2007).

LH on hormoon, mida toodetakse pulseerival moel naise ajuripatsis. See seostub LHCG-ile granuloosa rakkude pinnal, põhjustades progesterooni tootmist, ovulatsiooni ja kollakeha moodustumist. Pärast ovulatsiooni aitab see kaasa kollakeha normaalsele arengule (Casarini *et al.* 2012). Meeslootel toodab alates 15-20 rasedusnädalast testosterooni hCG asemel LH, mis on äärmiselt oluline sootunnuste edasiseks arenguks ning LH puudulikkuse korral edasist arengut ei toimu (Choi & Smitz, 2013).

Kui LH vastutab põhiliselt raseduse ettevalmistamise eest, siis hCG-d toodetakse valdavalt platsenta trofoblasti rakkudes raseduse vältel. Kui alguses peeti hCG rolliks vaid progesterooni tootmise ülevõtmist LH-lt, on praeguseks leitud, et see toimub vaid 3-4 nädala jooksul pärast embrüo kinnitumist. hCG sisaldus jõuab aga maksimumini alles 10. nädalaks ja väheneb seejärel sujuvalt raseduse vältel (Choi & Smitz 2013). hCG esineb mitme erineva vormina, millest olulisemad on tavaline heterodimeerne hCG, hüperglükosüleeritud hCG, eraldi hCG β -alaühik (mis võib samuti olla hüperglükosüleeritud) ning sulfateeritud hCG (Cole *et al.* 2011).

Kunstlik viljastamine

In vitro viljastamist (ingl. k. *in vitro fertilization*, IVF) on teostatud juba üle 30 aasta ning tänapäeva arenenud riikides on umbes 1% sündidest võimalikud tänu kunstlikule viljastamisele (Sutcliffe & Ludwig, 2007). Kõige kriitilisemaks etapiks on embrüo siirdamine, mis 75% juhtudest esmasel katsel ei õnnestu. Selle põhjuseks peetakse halva kvaliteediga embrüosid, mis ei ole võimelised tootma või sekreteerima piisaval hulgal signaalmolekule, mille järgi naise organism suudaks embrüot võõrkehast eristada. Seetõttu püütakse traditsioonilise morfoloogilise vaatluse asemel leida markermolekule, mille abil embrüo kvaliteeti hinnata (Licht *et al.* 2007).

Embrüo kvaliteedi markermolekulidena on väga palju uuritud inimese leukotsüüdi antigeeni (ingl. k. *Human leucocyte antigen*, HLA) klass Ib molekulid, eriti sHLA-G vormi. HLA molekulid ekspresseeritakse embrüo ja emakaseina kontaktpinnal ning väldivad embrüo lagundamist ema immuunsüsteemi poolt. Otsest seost eduka rasestumise ja kõrge HLA-G tasemega hetkel pole, väga madalat ekspressiooni seostatakse aga viljatusega. Paraku puudub hetkel piisavalt madala avastamispiiriga mõõtmismeetod ja sellest tulenevalt on keeruline määratleda, kus asub piir liiga madala ning piisava sHLA-G kontsentratsiooni vahel (Dahl & Hviid, 2012).

Eduka implantatsiooni jaoks on vajalik õige hormoonide tasakaal emakaseinal ja embrüos. Ovulatsioon on põhjustatud LH taseme järsust hüppest ning see kasv määrab ära implantatsiooni sobivaima aja. On leitud, et kuni 5 päeva jooksul pärast ovulatsiooni pole implantatsioon võimalik, üle 10 päeva hiljem aga suureneb eksponentsiaalselt raseduse katkemise oht. Lisaks sobivale ajavahemikule on olulised ka embrüo poolt saadetud signaalid hCG, interleukiini ja insuliinilaadse kasvufaktori kujul, ning ka emakaseina poolne vastus erinevate tsütokiinide ja kasvufaktoritega, mis on seotud embrüo arenguga. Ilma sellise keemilise suhtlusega implantatsiooni ei toimu (Licht *et al.* 2007).

IVF tehnikas on embrüo kvaliteedi hindamiseks markermolekulina võimalik rakendada hCG-d. Esimestel nädalatel toodab embrüo eelkõige hCG hüperglükosüleeritud vormi. Hinnanguliselt kahe kolmandiku spontaansete abortide põhjuseks IVF-s on embrüo mitteedukas implantatsioon, mida seostatakse liiga madala hüperglükosüleeritud hCG osakaaluga (alla 50% kogu hCG-st) implantatsiooni päeval, ühel kolmandikul juhtudest on tegu mõne geneetiline häirega (Cole, 2010). Seega on embrüo poolt sekreteeritud hCG määramine ja vastava meetodika arendamine oluline, kusjuures tähtis on määrata just bioloogiliselt aktiivse hormooni taset.

hCG määramine

Enamik tänapäeval kasutatavatest hCG (ning ka LH) määramise meetodikatest põhinevad kahe erineva antikeha kasutamisel: esimene on kinnitatud tahkele kandjale ning püüab lahusest hCG molekule, teine kinnitub fikseeritud hCG-le ning on märgistatud fluorofoori, radioaktiivmärgise või mõne muu detekteerimist võimaldava molekuliga. Sellisel põhimõttel toimivaid teste on tänapäeval nii labori- kui kodukasutuseks, nii uriini kui seerumi analüüsimiseks (Montagnana *et al.* 2011). Testide tundlikkus ja selektiivsus võib olla väga erinev. Paljud kommertsiaalsed testid ei suuda eristada hCG isovorme ning annavad tegelikest väärtustest tunduvalt kõrgemaid või madalamaid tulemusi (Cole *et al.* 2011). Küll aga on kirjeldatud elektrokemiluminestsentsi detekteerimisel põhinevat katset, mis suudab määrata vähemalt 99% spetsiifilisusega just hüperglükosüleeritud hCG-d juba 4,58 pg/ml kontsentratsiooni juures (Strom *et al.* 2012).

Lisaks antikehadel põhinevatele meetoditele on kasutatud ka füsikokeemilisi meetodeid nagu isoelektriline fokuksseerimine, kapillaarelektroforees, naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamidiideeli elektroforees ning pöördfaas kõrgefektiivset-vedelikkromatograafiat (Almeida *et al.* 2010). Vedelikkromatograafia puhul on probleemiks

tülikas ja põhjalikku ettevalmistust nõudev süsteem, teiste meetodite näol on aga tegu kvalitatiivsete või poolkvantitatiivsete meetoditega, mistõttu pole nende rakendamine raseduse kindlakstegemisel või embrüote kvaliteedi hindamisel võimalik.

Kasutades LHCGR-i kui sensorit, mis seob lahusest aktiivseid LH ja hCG molekule, saab detekteerida molekule, mida rakus retseptori aktiveerimise tagajärjel sünteesitakse. Meie laboris on juba varasemalt olemas sobiv tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) biosensor retseptorvahendatud rakusiseste vastuste analüüsimiseks, mida rakendati käesolevas töös LH ning hCG aktivatsiooni uurimisel.

cAMP

Adenülaadi tsüklaasi aktiveerimisel G-valgu α_s -alaühiku poolt katalüüsib ensüüm reaktsiooni, mille käigus toodetakse adenosintrifosfaadist (ATP-st) tsüklilist adenosiinmonofosfaati. cAMP on sekundaarne virgatsaine, mis reguleerib efektormolekulide kaudu rakkudes mitmeid protsesse, sealhulgas raku jagunemine, insuliini sekretsioon, ioonkanalite regulatsioon, metaboolsed protsessid, valkude tootmine jne. Efektormolekulideks on proteiinkinaas A (PKA), Epac- Valk (ingl. k. *exchange protein directly activated by cAMP*), cAMP-i retseptorvalgu (CRP) perekond, tsükliliste nukleotiidide poolt reguleeritud ioonkanalid ning teised membraanretseptorid (Gancedo, 2013).

Proteiinkinaas A on enim uuritud cAMP-i efektormolekul. Inaktiivses olekus on PKA kaks regulatoorset ja kaks katalüütilist alaühikut tetrameerse kompleksina, kusjuures katalüütiliste alaühikute substraadi sidumisdomeenid on regulatoorsete ühikute külge kinnitunud, sellest ka inaktiivne olek. Aktiivsesse olekusse üleminekuks peavad kummagi regulatoorse alaühiku mõlemad cAMP-i sidumisdomeenid seostuma cAMP-iga. Selle tagajärjel toimub valgu konformatsiooni muutus ja katalüütilised alaühikud dissotseeruvad kompleksi küljest. Aktiivne PKA fosforüleerib mitmesuguseid valke, reguleerides väga paljusid protsesse alates glükolüüsist kuni dopamiini ja epinefriini sünteesini (Lehninger *et al.* 2004)

Epac valku on kahte tüüpi: Epac1, millel on üks tsüklilist nukleotiidi siduv domeen, ja Epac2, kahe sellise domeeniga. cAMP-i sidumisel võivad mõlemad käituda guaniini vahetusfaktoritena väikestele GTPaasidele Rap1 ja Rap2. Epac valgud reguleerivad mitmeid cAMP vahendatud protsesse, nagu rakkude jagunemine, insuliini sekretsioon või südametöö. Kuigi Epac ja PKA saavad sõltumatult toimida, on reaalselt tegu nende mõjude pideva vaheldumisega (Gancedo, 2013).

Kui eukarüootides reguleerib cAMP transkriptsioonifaktoreid kaudselt, siis prokarüootides suudab cAMP seostuda otse teatud transkriptsioonifaktoritele. Esimene neist, CRP, leiti *Escherichia coli* bakteritest, ning cAMP-iga seostumisel suudab see interakteeruda üle 300 erineva DNA järjestusega, üldjuhul transkriptsiooni aktiveerides. Ka teistes bakterites on leitud CRP sarnaseid molekule, millel on paljud ühised funktsioonid, aga ka mitmed eripärad. CRP perekonda kuuluvad valgud on aja jooksul mitmekesisistunud, omandades spetsiifilisemaid funktsioone sõltuvalt seda ekspresseerivast bakterist (Gancedo, 2013).

cAMP-i akumulatsiooni ja sellest tuleneva efektormolekulide ülestimulatsiooni vältimiseks lagundatakse cAMP fosfodiesteri poolt, mida omakorda aktiveerivad paljudel juhtudel just cAMP-i efektormolekulid. Seega, cAMP kontsentratsiooni määrab nii adenülaadi tsüklaasi aktiivsus kui ka cAMP-i hüdrolyüsivad fosfodiesteri (Gancedo, 2013).

cAMP kontsentratsiooni jälgimine

Kuna cAMP reguleerib väga paljusid protsesse, on see ka paljude GPCR-idele suunatud ravimite toime vahendajaks ning seega on väga kasulik leida kiireid ja mugavaid meetodeid cAMP-i tootmise muutuste jälgimiseks. Kasutatavaid meetodeid on väga palju ja nende valik sõltub konkreetsest rakendusest ja soovitatavast informatsioonist (Hill *et al.* 2010).

Viimasel ajal leiavad üha enam kasutust Försteri resonantsenergia ülemineku (ingl. k. *Förster Resonance Energy Transfer, FRET*) biosensorid, mis koosnevad cAMP-i sidumistaskust ja selle külge kinnitatud kahest fluorofoorist, kusjuures viimased on valitud nii, et doonor fluorofoori kiirgusspekter kattub piisavas ulatuses akseptori ergastusspektriga. Kui sellised fluorestsentsmolekulid on teineteisele piisavalt lähestikku, on võimalik energia mittekiirguslik üleminek doonormolekulilt akseptormolekulile, mille tagajärjel muutub fluorofooride kiirguste intensiivsus teineteise suhtes (akseptori signaal võimendub, doonori oma nõrgeneb). cAMP-i seostumisel sidumistaskusse suureneb fluorofooride vaheline kaugus ja FRET väheneb. Seega, FRET signaali muutus sõltub cAMP-i kontsentratsiooni muutusest rakus (Hill *et al.* 2010, Mazina *et al.* 2012).

Käesolevas töös kasutati Epac-valgul põhinevat FRET^{TEpac^{VV}} biosensorit, millega on võimalik elusrakkudes teha mõõtmisi reaalajas, laias cAMP-i kontsentratsioonide vahemikus (Mazina *et al.* 2012). Tegu on 2004. aastal kirjeldatud CFP-Epac-YFP biosensori (van der Krogt *et al.* 2004) edasiarendusega, milles asendati 2008. aastal kollane fluorestsentsvalk kahe järjestikuse Venus fluorestsentsvalguga, millest üks oli tsirkulaarselt permuteeritud ^{cp173}Venus, mis parandas tänu paremale ruumilisele orientatsioonile FRET-i ulatust 44% võrra (van der

Krogt *et al.* 2008). Praeguseks on sensoris asendatud helesinine fluorestsentsvalk eredama, mTurquoise fluorofooriga, mis tõstis veelkord oluliselt FRET efektiivsust (Klarenbeek *et al.* 2011).

Lisaks lihtsustab mTurquoise valguga fluorestsentsi monoeksponentsiaalne kustumine (fluorestsentseluiga $\tau = 3,71$ ns) mõõtmisi fluorestsentseluea muutuse jälgimise kaudu. Puhkeolekus $^{\text{T}}\text{Epac}^{\text{VV}}$ konstrukti doonori mTurquoise eluiga ($\tau = 2,28$ ns) suureneb FRET vähenemisel pärast adenülaadi tsüklaasi 10 min stimulatsiooni 25 μM forskoliniga 100 μM IBMX juuresolekul 3,02 ns-le (Klarenbeek *et al.* 2011). Seega on antud biosensoriga võimalik detekteerida cAMP taseme tõusu elusrakus kuni 30% FRET muutuse kaudu jälgides vaid doonori fluorestsentseluiga.

Sensorivalgu ekspresseerimine

Mõõtmiste tegemiseks on vaja saavutada piisavalt suur sensorivalgu kontsentratsioon raku sees. Valke on võimalik rakkudesse viia mikrosüstimise või mõne transportmolekuli abil (Cleland *et al.* 2001; Koren *et al.* 2012), kuid selleks kulub palju valku ning suure tõenäosusega võõrvalgud lagundatakse enne katset või selle jooksul, lisaks on valguga funktsionaalsuse tagamiseks oluline õigete post-translatoorsete modifikatsioonide olemasolu. Seetõttu viiakse rakkudesse valkude tootmiseks vajalik informatsioon enamasti rekombinantse DNA kujul. Viirused on juba loomult väga efektiivsed DNA transportijad, mistõttu on nad transfektsiooni protsessis laialt kasutust leidnud (Heilbronn & Weger, 2010; Chen *et al.* 2011). Käesolevas töös kasutati BacMam ekspressioonisüsteemi, kus sensori geeni kandev bakteriaalset päritolu DNA viiakse imetajarakkudesse bakuloviiruse abil. BacMam süsteemi on GPCR-ide uurimiseks edukalt rakendatud väga paljude erinevate rakuliinide korral (Mazina *et al.* 2012, Kost *et al.* 2007, Condreay *et al.* 1999, O'Grady *et al.* 2011).

EKSPERIMENTAALNE OSA

Aparatuur ja materjalid

LH ja hCG mõju uurimiseks ja võrdlemiseks LHCG retseptorit ekspresseerivates rakkudes teostati katsed plaatfluorimeetriga PheraStar (BMG Labtech). Optilise mooduli ergastusfiltri läbilaskvus oli 427(20) nm ning kiirgusfiltrite läbilaskvus 480(20) ja 530(20) nm. Detektorite võimenduseks mõlemal lainepikkusel oli 1000 ja fokaalkõrguseks 4,2 mm. Temperatuuriks oli 37°C. Tulemuste analüüsimiseks ja graafiliseks kujutamiseks kasutati andmetöötlusprogrammi GraphPad Prism™ 4.03.

Katsete jaoks kasvatati COS-7 rakke (*Cercopithecus aethiops* ehk rohepärdiku neerurakud), mis ekspresseerivad püsivalt LHCG retseptorit (Müller *et al.* 2003), rakusöötmeks DMEM/F12 (PAA) + 10% FBS (Gibco) + streptomütsiin 0.1 mg/ml (PAA) + penitsilliin 100 U/ml (PAA) + Zeocin™ 60 µg/ml (InvivoGen) + Ultroser™ G 2% (PALL). Kasvatamiseks kasutati polülüsiiniga kaetud rakukasvatusplaate (Nunc), mõõtmiste jaoks 96-kohalisi musta värvi plaate (Corning). Rakkude eemaldamiseks kasvatusplaadilt kasutati 0,05% trüpsiini (PAA), rakkude pesemiseks DPBS-i (PAA). Rakukultuuride vaatlemiseks kasutati Olympus CKX31 mikroskoopi.

Bakuloviiruste paljundamiseks nakatati liblikalise *Spodoptera frugiperda* munasarjakoest eraldatud Sf9 rakuliini (Invitrogen), rakusöötmeks EX-CELL 420 (Sigma). Rakkude arvu ja elusrakkude osakaalu määramiseks kasutati 0.4% trüpaansinist (BioTop), loendati automaatse rakuloendusmasina TC10™ Automated Cell Counter (BioRAD) abil.

Hormoonide mõju uurimiseks katsesüsteemile kasutati kommertsiaalselt kättesaadavaid retseptiravimeid Luveris (rekombinantne LH, Serono), Pregnyl (rasedate naiste uriinist puhastatud hCG, Serono), Ovitrelle (rekombinantne hCG, Serono) ja Gonal-f (rekombinantne folliikuleid stimuleeriv hormoon FSH, Serono). Hormoonidest valmistati alglahused vastavalt ravimijuhendile kasutades süstelahuste asemel mQ vett. AC otseseks aktiveerimiseks kasutati forskolini (Tocris).

cAMP biosensori ekspresseerimine

Imetajarakkude transfekteeerimine toimus järgneva protokoll põhjal:

70% konfluentsetelt rakukasvatusplaatidelt eemaldati söötmelahus. Lisati plaadi kohta 4 ml RPMI söödet koos bakuloviirustega (nakatuskordsus MOI 100-300) ning inkubeeriti 3

tundi 37°C juures. Seejärel lisati 8 ml RPMI + 10% FBS + streptomütsiin 0.1 mg/ml + penitsilliin 100 U/ml + 5 mM naatriumbutanaat. Sensorvalgu ekspresseerimiseks inkubeeriti rakke 24h 37°C juures.

Mõõtmised plaatfluorimeetriga

Vähemalt tund aega enne katset eemaldati rakukasvatusplaatidelt söötmelahus, ning suspendeeriti rakud 11 ml-s DPBS-is. Rakud kanti 96-kohalistele katseplaatidele, 90 µl rakususpensiooni süvendi kohta, ning inkubeeriti tund aega 37°C juures. Valmistati mQ vees hormoonide seerialahjendused. Plaatfluorimeetriga mõõtmisel ergastati rakke 427 nm lainepikkusel ning registreeriti enne hormoonide lisamist algsed mTurquoise (*mTurq₀*) ja ^{cp173}Venus (*Venus₀*) fluorestsentsintensiivsused (vastavalt 480 nm ja 530 nm). Seejärel lisati süvendi kohta 10 µl ligandi 10X lahust, segati plaati ja registreeriti mTurquoise ja ^{cp173}Venus fluorestsentsintensiivsused iga viie minuti järel. FRET muutuste arvutamisel kasutati valemit:

$$\Delta \frac{Venus}{mTurq} = \frac{\frac{Venus_0}{mTurq_0} - \frac{Venus}{mTurq}}{\frac{Venus_0}{mTurq_0}}$$

cAMP taseme muutust väljendati FRET muutusena protsentides.

TULEMUSED JA ARUTELU

Meie laboris on FRET mõõtemetoodika abil uuritud mitmetes eri rakuliinides cAMP-i muutuseid vastusena retseptori aktivatsioonile (Mazina *et al.* 2013; Dzirkale *et al.* 2013; meie labori avaldamata andmed). Varasemalt on koostatud laboriprotokoll kindlate tingimustega viiruse tootmiseks, säilitamiseks, biosensori ekspresseerimiseks uuritavates imetajarakkudes ja mõõtmiste läbiviimiseks, mida kasutati ka käesoleva töö mõõtmiste teostamiseks.

Katsete põhjal selgus, et COS7-R rakud reageerivad hästi kasutatud tingimustele ning seetõttu jäeti protokoll samaks. Selleks, et valgu ekspressioon oleks piisav, oli mõningates katsetes vaja suurendada transfekkeerimisel kasutatava viiruse varu hulka, eriti pikema aja vältel säilitatud lahuste kasutamisel, kus viirust oli osaliselt lagunenu (kontsentreeritud viiruse varus agregaatide teke ja sadenemine). Hormoonidele mõõdetud EC_{50} väärtused valgu ekspressiooni taseme mõningasest muutusest ei sõltunud.

Luteiniseeriva hormooni ja kooriongonadotropiini preparaate võrdlus

COS7-R rakkudes biosensori funktsionaalsuse kontrollimiseks mõõdeti FRET-i muutust AC stimuleerimisel forskoliniga. Tulemusi analüüsiti sigmoidsete kontsentratsioon-vastus sõltuvuste mudeli põhjal. Nelja katsepäeva tulemuste keskmistamisel saadi forskolini pEC_{50} väärtuseks $6,1 \pm 0,2$. See väärtus on heas kooskõlas mitmetes teistes rakuliinides sama metoodikaga määratud tulemustega (Mazina *et al.* 2012; meie labori avaldamata andmed).

Olles veendunud, et $^{T}E_{pac}^{VV}$ sobib käesolevas COS7-R rakuliinis cAMP vastuse määramiseks, uuriti cAMP taseme muutust juba vastusena LH, hCG eri preparaatidele. Negatiivse kontrollina kasutati FSH preparaati. Mõõtmised teostati ainete seitsmel eri kontsentratsioonil ja tulemusi analüüsiti doos-vastus sõltuvuste mudelite abil (Tabel 1; Joonis 2).

Tabel 1: Hormoonide mõju LHCG retseptorile COS7-R rakkudes

	pEC₅₀ ± SEM
Ovitrelle	10,6 ± 0,2
Pregnyl	10,0 ± 0,2
Luveris	10,6 ± 0,1

Mõõtmised teostatud triplikaatides 30 minutit pärast hormooni lisamist rakkudele. Esitatud pEC₅₀ väärtused on neljal eri päeval mõõdetud ja analüüsitud tulemuste keskmised väärtused.

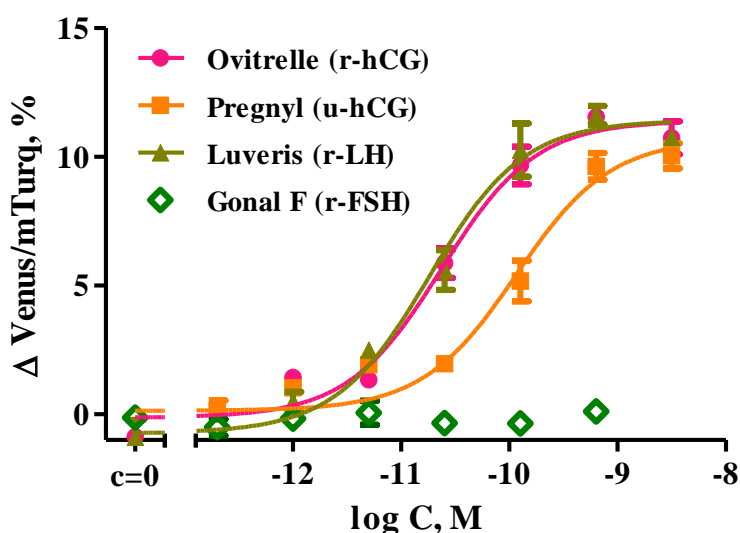
Kirjanduses leidub rohkelt andmeid nii hCG kui LH kvantiseerimise kohta veres ja uriinis, vähemal määral aga uuritakse nende poolt aktiveeritud signaalradasid. Casarini *et al* uurimisgrupis leiti, et hCG on ligi viis korda madalama EC₅₀ väärtusega kui LH (EC₅₀ vastavalt 107,1 ± 14,3 pM ja 530,0 ± 51,2 pM), kuid puudub oluline erinevus natiivse ja rekombinantse hCG vahel (Casarini *et al.* 2012). Oluline on välja tuua, et need mõõtmised teostati samuti COS7-R rakuliinis, kuid cAMP-i määramiseks lüüsi rakud 3 tundi pärast stimulatsiooni ning analüüsiti märgistatud cAMP-i konkureerimisel lüsaadis oleva cAMP-iga antikehadele seostumisel. cAMP akumulatsiooni tagamiseks kasutati fosfodiesterasaaside inhibiitori IBMX-i väga kõrget kontsentratsiooni (500 µM). Mõõdetud EC₅₀ väärtuste põhjal stimuleeriti edasistes protsessi jälgimise katsetes retseptorit erinevate hormoonide kontsentratsioonidega ning leiti, et LH abil saavutatakse maksimaalne aktivatsioon juba 10 minuti jooksul, hCG puhul aga ühe tunni möödudes.

Teises uurimisgrupis kasutati inimese embrüonaalseid neerurakke HEK293 LH ja hCG vastuste uurimiseks. Rakkudes ekspresseeriti LHCG retseptoreid, aktiveeriti neid LH ja hCG-ga ning analüüsiti cAMP vastuseid radioaktiivmärgisega cAMP ning lüsaadis esineva cAMP-i konkureerival seostumisel antikehadele. EC₅₀ väärtusteks saadi LH jaoks 0,14 IU/ml (IU – rahusvaheline ühik), hCG jaoks 0,12 IU/ml, kusjuures 1 mg hormoonile vastab LH puhul 5000 IU-d ja hCG puhul 14000 IU-d (Grzesik *et al.* 2014), mis molaarse kontsentratsiooni ühikutes on vastavalt 1 nM ja 234 pM.

Varasem, 2003. aastal avaldatud artikkel ei täheldanud samuti olulisi erinevusi natiivsete hormoonide hCG ja LH poolt indutseeritud cAMP-i tootmises (EC₅₀ väärtused vastavalt 303,0 ± 52,5 IU/l ja 213,2 ± 23,3 IU/l), kasutades antikehadel baseeruvat cAMP

määramismetoodikat (Müller *et al.* 2003). Neil kasutusel oleva varasema standardi põhjal vastab 1 milligrammile hormoonile LH puhul 5360 IU-d ja hCG puhul 14980 IU-d, mille põhjal EC₅₀ väärtused oleksid vastavalt 1,42 nM ja 551 pM.

Kõigil kolmel juhul kasutatakse märgistatud ja märgistamata cAMP-i konkureerivat seostumist, mis vajab eelnevat rakkude lüüsimist. cAMP akumulereerumist põhjustav IBMX oli kasutusel Müller *et al* ning Casarini *et al* poolt läbi viidud katsetes, mõlemal juhul väga kõrge kontsentratsiooni juures. Reaalset erinevust hormoonide aktiivsuses täheldatakse aga vaid Casarini *et al* uurimisgrupis, kus paraku pole avaldatud ümberarvutusfaktoreid kasutatud kontsentratsioonide ja IU-de vahel.



Joonis 2: Hormoonide mõju LHCG retseptorile COS7-R rakkudes. Mõõtmised teostatud triplikaatides 24h pärast rakkude nakatamist ^{TE}Epac^{vv} BacMam viirustega. FRET-i muutus mõõdetud 30 minutit pärast hormoonide lisamist. Esitatud on neljal eri päeval teostatud korduskatsest ühe katse tulemused.

Rekombinantsed valgud on üsna homogeensed, samas kui kehaomased valgud on pigem heterogeensed. Sellest tingituna on oluline teada ning arvestada konkreetse preparaadi päritolu ja kalibreerida tulemusi õige standardiga. Rekombinantset hCG-d sisaldav ravim Ovitrelle on pakendis kontsentratsiooniga 250 mikrogrammi 0,5 ml kohta, ning sisaldab 6500 IU-d. Uriinist puhastatud hCG-d sisaldav Pregnyl aga annab infolehel sisalduseks 5000 IU-d, millest molaarne kontsentratsioon saadi viienda rahvusvahelise standardi järgi (425 IU/l = 1 nM; Stenman, 2013). IU võtab arvesse vaid aktiivse hormooni hulka, molekulmass ning selle kaudu leitud molaarne kontsentratsioon aga näitab kogu hormooni hulka lahuses (Stenman, 2013).

Mõõdetud tulemuste relevantsuse tagamiseks ning uurimisgruppide vaheliste võrdluste lihtsustamiseks peavad kasutatud kontsentratsioonid ja leitud aktiivsused olema seotud standardpreparaatidega.

Meie katsetes rekombinantsete LH ning hCG EC_{50} väärtused olulisel määral ei erinenud ning näitasid mõlemal juhul suuremat, 30-40 pM bioloogilist aktiivsust 30 minutit pärast retseptori stimuleerimist hormoonidega. Ühtlasi ei nähtud reaalses mõõtmistega ühesuguses kontsentratsioonide vahemikus erinevusi LH ja hCG kineetikas: maksimaalse efekti saamiseks kulus mõlema hormooni korral vähemalt 20 minutit. Katsetes esines tendents, kus rekombinantsel hCG-l on veidi parem bioloogiline aktiivsus kui uriinist puhastatud preparaadil (Joonis 2), samas Tabel 1 kohaselt vea piirides olulist erinevust ei ole. Oluline on välja tuua, et eri preparaate sisaldasid infot erineval kujul (u-hCG/Pregnyl: 5000 IU/ml; r-hCG/Ovitrelle: 6500 IU, 250 µg/0,5 ml; r-LH/Luveris 75 IU/ml). Pregnyl kontsentratsiooni leidmiseks kasutati hCG viiendat rahvusvahelist standardit (Stenman, 2013), Luverise puhul rekombinantse LH rahvusvahelist standardit (WHO International Standard). Kirjanduse andmetel FSH, hoolimata suurest struktuursest homoloogiast LH-ga, LHCGR-ile mõju ei oma (Costagliola *et al.* 2005; Molés *et al.* 2011) ning ka meie katses negatiivse kontrollina füsioloogiliselt relevantsetes kontsentratsioonide vahemikus FSH cAMP vastust ei tekitanud (Joonis 2).

Meie meetodiga mõõdetud LH ja hCG aktiivsused on märgatavalt madalamad kui konkureeriva sidumise meetodil, kuid ebakõlasid esineb ka sama meetodit kasutanud eri uurimisgruppide vahel. Seega võivad erinevused olla põhjustatud mõnest teisest tegurist. Rekombinantse hCG suur homogeensus võrreldes natiivse hormooniga võib põhjustada ebakõlasid katsetulemustes, kuna standardina kasutatakse hetkel uriinist puhastatud hCG-d. Lisaks võib mõju avaldada IBMX, mille kasutamise vajalikkus, kontsentratsioon ja inkubatsiooniaeg varieeruvad sõltuvalt konkreetse uurimisgrupi laboripraktikast. Käesolevas töös IBMX-i ei kasutatud, kuna saame akumulatsiooni asemel jälgida reaalses cAMP-i tootmist. Ühtlasi ei ole biosensorit kasutades vaja rakke lüüsida ning süsteem püsib looduslähedasem, millel võib samuti olla mõju katsetulemustele ning anda eelkõige parema ülevaate reaalse süsteemi toimimisest.

Edasisi rakendusi

Katsetulemustest on näha, et $TEpac^{VV}$ biosensor sobib LHCGR vahendatud cAMP kontsentratsiooni muutuste analüüsimiseks COS7-R rakkudes. Käesolevas töös järgiti teiste

rakuliinide puhul kasutatud protokoll, mis näitab BacMam ekspressioonisüsteemi laia rakendatavust.

Arvestades hCG kui markeraine potentsiaali embrüote selekteerimisel, võib see töö olla oluliseks aluseks aktiivsete hormoonide kontsentratsiooni määramiseks kasvulahustes. Meetodika valideerimiseks on järgmiseks vaja läbi viia hulk katseid kliiniliste proovidega ning uurida hormoonide kontsentratsioonide korrelatsiooni eduka implantatsiooni ja rasedusega. Meie sensorsüsteem võib olla kiire ja usaldusväärne meetod IVF õnnestumistõenäosuse parandamiseks, mis omakorda aitaks vähendada kunstliku viljastamisega seotud kulutusi ning muuta protseduuri patsientide jaoks vähem tülikaks. Töö on valminud ja jätkub koostöös Reproductiivmeditsiini Teadusarenduskeskusega.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös rakendati Försteri resonantsenergia ülekandel põhinevat cAMP biosensorit COS7-R rakuliinis luteiniseeriva hormooni (LH)/inimese kooriongonadotropiini (hCG) retseptori aktivatsiooni uurimiseks. Kirjanduse ülevaates kirjeldati lühidalt G-valguga seotud retseptorite poolt vahendatud signaaliülekannet, sealhulgas töös uuritud hormoonretseptorit. Pikemalt peatuti luteiniseeriva hormooni ja inimese kooriongonadotropiini rollil raseduses ja praeguse hetke kõige mitmekülgsemal viljatusravi meetodil: kunstlikul viljastamisel. Tutvustati ka cAMPi ja selle kontsentratsioonimuutuste jälgimiseks kasutatud biosensorit.

Näidates, et adenülaadi tsüklaasi otsesel aktivatsioonil forskoliniga on $^{T}E_{pac}^{VV}$ BacMam biosensorsüsteem käesolevas töös kasutatud rakuliinis funktsionaalne ja sobib cAMP taseme muutuste määramiseks, teostati kõik katsed kasutades varasemalt koostatud laboriprotokolli. Sensorsüsteemi rakendati LH ja hCG bioloogilise aktiivsuse võrdlemiseks ning saadud tulemusi võrreldi kirjanduses teistel meetoditel saadud andmetega. Tulemuste analüüsil arutleti rekombinantsete ning looduslike hormoonide erinevuse ja korrektsete standardite kasutamise üle.

Käesolev töö demonstreeris $^{T}E_{pac}^{VV}$ biosensori rakendatavust LHCG retseptori vahendatud signaaliülekande uurimiseks ja retseptori ligandide iseloomustamiseks. Töö on aluseks edasistele uuringutele hCG kontsentratsiooni määramisel embrüo kasvulahustes.

Study of the activation of luteinizing hormone / human chorionic gonadotropin receptor with LH and hCG

Tanel Luik

SUMMARY

This thesis describes the implementation of a cyclic adenosine monophosphate (cAMP) biosensor based on Förster resonance energy transfer for studying the activation of luteinizing hormone (LH)/human chorionic gonadotropin (hCG) receptor in COS7-R cell line. The theoretical part of the thesis gives a short overview of signal transduction by G-protein coupled receptors, including the hormone receptor in question. A more detailed description is given on the role of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin in pregnancy and *in vitro* fertilization. Also, the biosensor used for observing changes in cAMP concentrations was characterized.

By showing the functionality of ^TEpac^{VV} BacMam biosensor system through the direct activation of adenylate cyclase with forskolin, all following experiments were performed using a previously established protocol. The sensor system was used for comparing the biological activities of LH and hCG, which were then compared with results obtained with other methods. The importance of using suitable standards and the differences between recombinant and native hormones were discussed.

The thesis demonstrates the applicability of ^TEpac^{VV} biosensor for the study of LH/hCG receptor-mediated signal transduction and the characterization of hormones, which is fundamental for quantification of hCG in embryo culture medium in the future.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Almeida, B. E., J. E. Oliveira, C. M. Carvalho, S. L. Dalmora, P. Bartolini, and M. T. C. P. Ribela. "Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high-performance liquid chromatography." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 53, no. 1 (2010): 90-97.
- Brady, Scott, George Siegel, R. Wayne Albers, Donald Price, eds. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Academic Press, 2005.
- Casarini, Livio, Monica Lispi, Salvatore Longobardi, Fabiola Milosa, Antonio La Marca, Daniela Tagliasacchi, Elisa Pignatti, and Manuela Simoni. "LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling." *PloS one* 7, no. 10 (2012): e46682.
- Chen, Chi-Yuan, Chin-Yu Lin, Guan-Yu Chen, and Yu-Chen Hu. "Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications." *Biotechnology advances* 29, no. 6 (2011): 618-631.
- Cleland, Jeffrey L., Ann Daugherty, and Randall Mrsny. "Emerging protein delivery methods." *Current opinion in biotechnology* 12, no. 2 (2001): 212-219.
- Cole, Laurence A. "Hyperglycosylated hCG, a review." *Placenta* 31, no. 8 (2010): 653-664.
- Cole, Laurence A., Stephen DuToit, and Trefor N. Higgins. "Total hCG tests." *Clinica Chimica Acta* 412, no. 23 (2011): 2216-2222.
- Condreay, J. Patrick, Sam M. Witherspoon, William C. Clay, and Thomas A. Kost. "Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, no. 1 (1999): 127-132.
- Costagliola, Sabine, Eneko Urizar, Fernando Mendive, and Gilbert Vassart. "Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors." *Reproduction* 130, no. 3 (2005): 275-281.
- Dahl, Mette, and Thomas Vauvert F. Hviid. "Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss." *Human reproduction update* 18, no. 1 (2012): 92-109.
- Dzirkale, Zane, Juris Rumaks, Simons Svirskis, Olga Mazina, Anni Allikalt, Ago Rinken, Kaspars Jekabsons, Ruta Muceniece, and Vija Klusa. "Lunasin-induced

behavioural effects in mice: focus on the dopaminergic system." *Behavioural brain research* 256 (2013): 5-9.

- Dufau, Maria L. "The luteinizing hormone receptor." In *The Leydig Cell in Health and Disease*, pp. 227-252. Humana Press, 2007.
- Gancedo, Juana M. "Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life." *Biological Reviews* (2013).
- Grzesik, Paul, Anke Teichmann, Jens Furkert, Claudia Rutz, Burkhard Wiesner, Gunnar Kleinau, Ralf Schüle, Jörg Gromoll, and Gerd Krause. "Differences Between Lutropin-And Choriogonadotropin-Mediated Receptor Activation." *FEBS Journal* (2014).
- Heilbronn, Regine, and Stefan Weger. "Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics." In *Drug Delivery*, pp. 143-170. Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- Hill, Stephen J., Christine Williams, Lauren T. May. "Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies." *British journal of pharmacology* 161, no. 6 (2010): 1266-1275.
- Janet Choi and Johan Smits. "Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles." *Gynecological Endocrinology* 0 (2013): 1-8.
- Klarenbeek, Jeffrey B., Joachim Goedhart, Mark A. Hink, Theodorus WJ Gadella, and Kees Jalink. "A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range." *PLoS One* 6, no. 4 (2011): e19170.
- Koren, Erez, and Vladimir P. Torchilin. "Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side." *Trends in molecular medicine* 18, no. 7 (2012): 385-393.
- Kost, Thomas A., J. Patrick Condreay, Robert S. Ames, Stephen Rees, and Michael A. Romanos. "Implementation of BacMam virus gene delivery technology in a drug discovery setting." *Drug discovery today* 12, no. 9 (2007): 396-403.
- Lagerström, Malin C., Helgi B. Schiöth. "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery." *Nature reviews Drug discovery* 7, no. 4 (2008): 339-357.
- Lehninger, Albert, D. Lee Nelson, and Michael M. Cox. "Lehninger's Principles of Biochemistry." (2005).

- Licht, P., H. Fluhr, J. Neuwinger, D. Wallwiener, and L. Wildt. "Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation?." *Molecular and cellular endocrinology* 269, no. 1 (2007): 85-92.
- Mazina, Olga, Reet Reinart-Okugbeni, Sergei Kopanchuk, Ago Rinken. "BacMam System for FRET-Based cAMP Sensor Expression in Studies of Melanocortin MC1 Receptor Activation." *Journal of Biomolecular Screening* 17, no. 8 (2012): 1096-1101.
- Molés, Gregorio, Silvia Zanuy, Iciar Muñoz, Berta Crespo, Iago Martínez, Evaristo Mañanós, and Ana Gómez. "Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (Fsh and Lh) produced in different host systems." *Biology of reproduction* 84, no. 6 (2011): 1171-1181.
- Montagnana, Martina, Tommaso Trenti, Rosalia Aloe, Gianfranco Cervellin, and Giuseppe Lippi. "Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics." *Clinica Chimica Acta* 412, no. 17 (2011): 1515-1520.
- Müller, Thomas, Jörg Gromoll, and Manuela Simoni. "Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, no. 5 (2003): 2242-2249.
- Nikolaev, Viacheslav O., Moritz Bünemann, Lutz Hein, Annette Hannawacker, Martin J. Lohse. "Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation." *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 36 (2004): 37215-37218.
- O'Grady, Michael, Robert H. Batchelor, Kelly Scheyhing, Christopher W. Kemp, George T. Hanson, and Uma Lakshmipathy. "BacMam-mediated gene delivery into multipotent mesenchymal stromal cells." In *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*, pp. 485-504. Humana Press, 2011.
- Patrick, Graham L. *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford University Press, 2013.
- Ponsioen, Bas, Jun Zhao, Jurgen Riedl, Fried Zwartkruis, Gerard van der Krogt, Manuela Zaccolo, Wouter H. Moolenaar, Johannes L. Bos, Kees Jalink. "Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator." *EMBO reports* 5, no. 12 (2004): 1176-1180.

- Puett, D., Y. Li, G. DeMars, K. Angelova, and F. Fanelli. "A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein." *Molecular and cellular endocrinology* 260 (2007): 126-136.
- Rao, C. V., Z. M. Lei. "The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine." *Molecular and cellular endocrinology* 269, no. 1 (2007): 2-8.
- Stenman, Ulf-Håkan. "Standardization of hormone determinations." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 27, no. 6 (2013): 823-830.
- Strom, Charles M., Ruben Bonilla-Guererro, Ke Zhang, Kevin J. Doody, David Tourgeman, Ruben Alvero, Marcelle I. Cedars et al. "The sensitivity and specificity of hyperglycosylated hCG (hhCG) levels to reliably diagnose clinical IVF pregnancies at 6 days following embryo transfer." *Journal of assisted reproduction and genetics* 29, no. 7 (2012): 609-614.
- Sutcliffe, Alastair G., and Michael Ludwig. "Outcome of assisted reproduction." *The Lancet* 370, no. 9584 (2007): 351-359.
- Ziecik, Adam J., Monika M. Kaczmarek, Agnieszka Blitek, Anna E. Kowalczyk, Xiangdong Li, Nafis A. Rahman. "Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor." *Molecular and cellular endocrinology* 269, no. 1 (2007): 51-60.
- van der Krogt, Gerard NM, Janneke Ogink, Bas Ponsioen, Kees Jalink. "A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example." *PLoS One* 3, no. 4 (2008): e1916.
- van Koppen, Chris J., Guido JR Zaman, C. Marco Timmers, Jan Kelder, Sietse Mosselman, Ruud van de Lagemaat, Martin J. Smit, and Rob GJM Hanssen. "A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 378, no. 5 (2008): 503-514.
- WHO International Standard, Luteinizing hormone, recombinant, NIBSC code: 96/602; <http://www.nibsc.org/documents/ifu/96-602.pdf> viimati alla laetud 29.05.2014.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, TANEL LUIK,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
LUTEINISEERIVA HORMOONI JA INIMESE KOORIONGONADOTROPIINI
RETSEPTORI UURIMINE LH JA HCG VÕRDLUSENA,

mille juhendaja on Olga Mazina, MSc,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **28.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2015**